

中性蛋白酶（Neutral protease, NPT）试剂盒说明书

（货号：BP10362W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

蛋白酶广泛存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中，中性蛋白酶（NPT）是在中性条件下将酪蛋白水解产生酪氨酸；酪氨酸与福林酚在碱性条件下反应生成蓝色化合物；该蓝色物质在 680nm 有特征吸收峰，进而得中性蛋白酶活性。

由于底物酪蛋白自身含有多种氨基酸，所以在检测过程中必须设置带有底物酪蛋白的对照，以扣除有干扰的背景值，排除假阳性。

二、测试盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入 3mL 试剂二 90℃加热搅拌至分散； 3. 再加 27mL 提取液搅拌至溶解； 4. 配置完的试剂 4℃保存，三天内用完。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	1. 用前摇匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	1. 用前摇匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	1. 用前摇匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 现用现配，开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 20mL 蒸馏水，4℃保存，一星期内用完。
标准品	粉体 1 支 EP	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【注】：试剂一若在磁力搅拌器（带温控）上溶解，可用锡箔纸或保鲜膜盖住烧杯，以免溶解过程中水分蒸发过快。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、磁力搅拌器、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：测定管和对照管分别取约 0.1g 组织（水分充足的果实约 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；12000rpm，4℃离心 15min；取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌/真菌样本：测定管和对照管分别取约 500 万细胞加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率

300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min) ; 12000rpm, 4℃离心 15min; 取上清液待测。

【注】：若增加样本量, 按细菌或细胞数量 (10^4 个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 比例进行提取

③ 液体样本: 澄清液体直接检测; 若浑浊则 12000rpm, 4℃离心 15min; 上清待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 680nm, 配制好的试剂一需预先 50℃水浴 10min。

② 在 2mL 离心管中依次加入下列试剂培养:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	500	500
试剂一	500	
40℃振荡培养 10min, 同时, 余下的试剂一须单独 40℃振荡培养 10min		
上步单独 40℃培养的试剂一		500
试剂三	500	500
混匀, 室温静置 10min, 1500rpm (须准确), 4℃离心 10min, 上清液待用		

③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

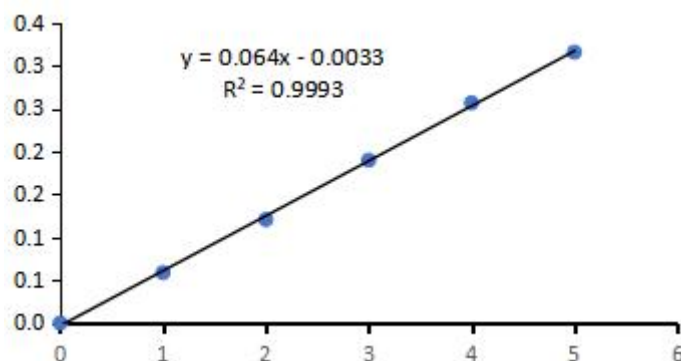
上清液	250	250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴 20min, 取 200μL 澄清液 (若浑浊, 可 1500rpm 离心 10min) 至 96 孔板中, 于 680nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可以加大样本量 (如增加到 0.2g), 或延长 40℃培养时间 (如增加至 30min), 或在显色反应阶段加大上清液体积 (如, 增加至 350μL, 则试剂五相应减少), 则改变后的样本质量 W, 反应时间 T 和显色步骤中的上清液体积 V1 需代入公式重新计算。

2. 若测定管的 A 值大于 1.5, 可减少样本取样量 (如减少到 0.05g), 或把上清液用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入公式参与计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.064x - 0.0033$, x 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算:

活性单位定义: 40℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0033) \div 0.064 \times (V_3 \div V_2) \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \div T \times D \\ = 18.8 \times (\Delta A + 0.0033) \div C_{\text{pr}} \times D$$

3、按照样本质量计算:

活性单位定义: 40℃每克样品每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0033) \div 0.064 \times (V_3 \div V_2) \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ = 18.8 \times (\Delta A + 0.0033) \div W \times D$$

4、按照细胞数量计算：

活性单位定义：40℃每 10⁴ 个细胞每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0033) \div 0.064 \times (V_3 \div V_2) \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \div T \times D \\ = 18.8 \times (\Delta A + 0.0033) \div \text{细胞数量} \times D$$

5、按液体体积计算：

活性单位定义：40℃每毫升液体样本每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0033) \div 0.064 \times (V_3 \div V_2) \div V_4 \div T \times D = 18.8 \times (\Delta A + 0.0033) \times D$$

V---提取液体积，1mL； V1---样本体积，0.5mL； V2---显色步骤上清液体积，0.25mL；

V3---培养步骤总反应体积，1.5mL； V4---液体样本，0.5mL； 酪氨酸分子量---181.19；

T---反应时间，10min； W---样本质量，g； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒检测。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品溶于 100mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液中（两天内用完且-20℃保存），标准品母液浓度为 100 μg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 4, 8, 12, 16, 20. μg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 400uL，加入 1600uL 蒸馏水，混匀得到 20ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μg/mL	0	4	8	12	16	20
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	250	
蒸馏水		250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴 20min，取 200μL 澄清液（若浑浊，可 1500rpm 离心 10min）至 96 孔板中，于 680nm 读取吸光值 A， △A=A 测定-0 浓度管。		